Untersuchungen über die Änderung der elektrophoretischen Beweglichkeit eines Anti-Peroxidase-Antikörper produzierenden Zellclonus während der Immunantwort

Edith Elisabeth Holzberg

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546016_0042

AUS DEM MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, MARTINSRIED BEI MÜNCHEN
(Abt. HANNIG)
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. F. Lynen

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ÄNDERUNG DER ELEKTROPHORETISCHEN BEWEGLICHKEIT EINES ANTI-PEROXIDASE-ANTIKÖRPER PRODUZIERENDEN ZELLCLONUS WÄHREND DER IMMUNANTWORT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Edith Elisabeth Holzberg
geb. Schmidt
aus Szeged (Ungarn)

München 1972

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichts

Berichterstatter: Professor Dr. Kurt Hannig
Mitberichterstatter: Professor Dr. Theodor Bücher
Dekan: Professor Dr. med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 10. 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALT

I. Einleitung

II. Material und Methoden

II.1. Immunisierung der Versuchstiere

II.2. Gewinnung des Zellmaterials

II.3. Elektrophorese

II.4. Die elektrophoretische Verteilungsprofile anti-Peroxidase-bildender Zellen

II.4.1. Anfertigung von Zytozentrifugenpräparaten

II.4.2. Inkubation mit Antigen

II.4.3. Histochemischer Peroxidase-Nachweis

II.4.4. Auswertung der Präparate

II.4.5. Standardisierung und statistische Auswertung

III. Ergebnisse

III.1. Prüfung der zufälligen Verteilung der kernhaltigen Zellen auf dem Zytozentrifugenimprint

III.2. Prüfung der elektrophoretischen Verteilung von Lymphknotenzellen sowie Plasmazellen und Blasten

III.2.1.-III.2.5 Elektrophoretische Zellverteilung 72, 84, 96, 108 und 120 Stunden nach Immunisierung mit Peroxidase

III.3. Kontrollergebnisse

IV.1. Diskussion der Methode

IV.2. Diskussion der Trennergebnisse

V. Zusammenfassung

Literatur

Abkürzungen

EPM : electrophoretic mobility
(elektrophoretische Beweglichkeit)

PBS : Phosphat buffered saline
(Phosphat-Puffer in physiologischer Kochsalzlösung

POX : Meerrettich-Peroxidase

Ag : Antigen

AK : Antikörper

Untersuchungen über die Änderung der elektrophoretischen Beweglichkeit eines anti-Peroxydase-Antikörper produzierenden Zellclonus während der Immunantwort

I. Einleitung

I.1.

Um einen besseren Einblick in Immunreaktionsmechanismen zu gewinnen, ist es nötig, Subpopulationen immunkompetenter Zellen physikalisch zu isolieren. Dazu sind in letzter Zeit verschiedene präparative Zelltrennmethoden entwickelt worden, die auf physikalischen Eigenschaften der Zelle, wie elektrischer Ladung, Dichte, Volumen, Sedimentationsgeschwindigkeit und Oberflächenhaftung, beruhen. Diese Zelltrennmethoden sind jedoch nur dann von Nutzen, wenn parallel dazu eine Trennung in funktionell einheitliche Zellpopulationen erzielt werden kann. Die Methode der präparativen trägerfreien Ablenkungselektrophorese (1) benützt die Eigenschaft der Zelle, bei physiologischem pH aufgrund ihrer negativen Oberflächenladung im elektrischen Feld zu wandern. Die Frage, ob sich Zellen mit dieser Methode in funktionell homogene Subpopulationen auftrennen lassen, kann am Verteilungsmuster antikörperbildender Zellen im elektrophoretischen Zelldiagramm geprüft werden.

Die antikörperbildende Zelle unterscheidet sich von allen anderen Säugetierzellen durch ihre excessive Syntheserate

eines homogenen Globulins. Mit Hilfe des komplementären Antigens kann dieses Globulin, der Antikörper, eindeutig charakterisiert werden. In den letzten Jahren wurden Mikromethoden entwickelt, die es gestatten, mit Hilfe eines Antigens den homologen Antikörper am Ort der Synthese, d.h. in der Zelle selbst nachzuweisen (2 , 3).

Damit ist eine genaue Spezifizierung der antikörperbildenden Zelle möglich, wodurch sie sich in ihren verschiedenen Entwicklungsphasen eindeutig einem bestimmten Clonus zuordnen läßt.

I.2.

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß bei Ratte und Maus die frühen Entwicklungsstufen der antikörperbildenden Zellen (Lymphozyten und Blasten) geringere elektrophoretische Beweglichkeiten besitzen als die späteren Entwicklungsstufen (unreife und reife Plasmazellen) (4). Die Versuche wurden an 19 S Hämolysin produzierenden Zellen durchgeführt. Diese Änderung der elektrophoretischen Beweglichkeit kann verschiedene Modi haben.

Grundsätzlich ist zu unterscheiden zwischen echten Umstrukturierungen der Zellmembran und unspezifischen Veränderungen des Zetapotentials durch adsorbierte Substanzen. Für einen echten Umbau der Zellmembran spricht der Befund, daß B Zellen während ihrer Umwandlung zu Plasmazellen ihre immunglobulinartigen Oberflächenrezeptoren verlieren (5). Diese

Verluste müssen nicht notgedrungen eine Änderung der EPM hervorrufen, können jedoch ein Hinweis sein für Umwandlungen der Oberflächenkonformation. Eine weitere strukturelle Umwandlung, die Änderungen der EPM bewirkt, wurde bei Zellen diskutiert, die hohe Mitoseraten aufweisen (6, 7). Da antikörperbildende Zellen sehr stark proliferieren, können hier ähnliche Mechanismen diskutiert werden. Neben diesen echten Strukturumwandlungen der Oberflächenmembran kann die Beweglichkeit auch beeinflußt werden durch Adsorption von sezernierten Immunglobulinen. Die antikörpersezernierende, unreife und reife Plasmazelle hat eine hohe Immunglobulinkonzentration auf ihrer Oberfläche im Gegensatz zu Blasten und synthetisierenden Lymphozyten - in diesen Zellen wird der Antikörper im wesentlichen im perinukleären Raum gespeichert und nur in geringem Maße sezerniert (8). Man kann sich daher vorstellen, daß durch diesen Mantel die Beweglichkeit der Zelle beeinflußt werden kann.

I. 3. Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen geklärt werden:

1) Zeigen antikörperbildende Zellen anderer Spezifität als 19 S-antikörperbildende Zellen gleiche EPM und ähnliche Änderungen der elektrophoretischen Beweglichkeiten während des Differenzierungsprozesses?
2) Können diese Änderungen durch direkte lichtmikroskopische Beobachtungen der spezifischen Zelltypen nachgewiesen werden?

3) Sind die elektrophoretischen Verteilungsdiagramme der spezifischen Zelltypen Gauß'sche Verteilungsmuster?

Zu diesem Zweck wurde eine von LEDUC und AVRAMEAS (9) erstmals angegebene Nachweismethode benutzt, die als Immunogen das Enzym Meerrettichperoxydase (POX) verwendet. Dieses Antigen kann wegen seines geringen Molekulargewichts (40 000) die intakte Zellmembran permieren und kann nach Konjugation an den komplementären Antikörpern histochemisch nachgewiesen werden. Durch die Ag-AK-Bindung wird die Enzymaktivität nur unwesentlich beeinflußt (10), so daß die Spaltung des Substrats H_2O_2 histochemisch in der Zelle nachweisbar ist. Der enzymatische Antikörpernachweis ist deshalb so empfindlich, weil das Enzym ein Vielfaches der Substratmoleküle spalten kann (11). Dadurch können bereits geringe Mengen von spezifisch gebundenem Antigen sichtbar gemacht werden, was vor allem den Nachweis von Antikörpern in Zellen früher Entwicklungsstadien ermöglicht (12).

II. Material und Methoden

II. 1. Immunisierung der Versuchstiere

In allen Versuchen wurden männliche, isogene Wistarratten (Ges. f. Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg/München) im Alter von 3 - 4 Monaten verwendet.

Peroxidase (E 1.11.7, Reinheitsgrad II. Lyophylisat) wurde von Fa. Boehringer, Mannheim bezogen. Für die Immunisie-

rung wurde eine 1 %ige Lösung in steriler physiologischer Kochsalzlösung verwendet.

Die Versuchstiere wurden mit einer Dosis von 10 mg Peroxidase und 0,1 ml Freund's Komlettem Adjuvans i.p. immunisiert.

II. 2. Gewinnung des Zellmaterials

Präparation:

72 Stunden nach der Immunisierung wurden in 12-stündigen Abständen aus je 5 Tieren die abdominalen Lymphknoten entnommen, die Kapseln entfernt und die Knoten vorsichtig in mit 20 % Kälberserum supplementiertem TC-Medium Puck G (Difco) mit Nadeln zerzupft. Die erhaltene Zellsuspension wurde durch eine dünne Watteschicht filtriert und anschließend bei 100 x g 10 Minuten zentrifugiert. Nach Waschen mit TC-Medium Puck G und mit Elektrophorese-Trennkammerpuffer wurden die Zellen in letzterem resuspendiert und auf eine Konzentration von 2×10^7 kernhaltige Zellen/ml eingestellt. Diese Zellsuspension wurde anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

II. 3. Elektrophorese (13)

Zur Trennung wurde die von HANNIG entwickelte (14) trägerfreie Elektrophoreseapparatur, Typ IV, verwendet (Desaga, Heidelberg, Bender & Hobein, München und Brinkmann Instruments, Westbury, N.Y., USA). Die Trennungen wurden unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt: Trennkammerpuffer: 0,015 M Triäthanolamin, 0,01 M Glukose, 0,004 M Kalium-

Acetat und 0,24 M Glycin. Der Puffer wurde durch Zugabe von Eisessig auf einen pH von 7,4 eingestellt, die Osmolarität mittels Saccharose auf 0,300 - 0,310 Osm gebracht. Die Leitfähigkeit betrug $9 \times 10^{-4} \Omega^{-1} \cdot cm^{-1}$. Elektrodenpuffer: 0,075 M Triäthanolamin, 0,004 Kalium-Acetat, wurde ebenfalls mit Eisessig auf pH 7,4 eingestellt. Die Trennungen erfolgten bei 6°C, und einer elektrischen Feldstärke von 100 V/cm. Jede Zelle befand sich 240 sec. im elektrischen Feld. In einer Stunde wurden 6×10^7 Zellen getrennt. Gleiche Volumina der getrennten Fraktionen wurden bei 4°C in Reagenzgläsern gesammelt, die je 1 ml Puck G (Difco) enthielten, dem 10 % Kälberserum zugesetzt war. Die Zellkonzentration jeder Fraktion wurde mit einem elektronischen Zellzähler bestimmt (Coulter Counter, Modell A).

Um die einzelnen Fraktionen zu charakterisieren, wurde deren apparente elektrophoretische Beweglichkeit genau bestimmt. Die hierzu nötigen Messungen wurden folgendermaßen durchgeführt: Diejenige Fraktion, die der Klasse $u_{app} = 0$ (umxcm/Vxsec) entsprach, wurde durch elektrophoretische Trennung des elektrisch neutralen Farbstoffs N.2.4. - dinitrophenylethanolamin bestimmt. Die Ablenkung der Zellen in den einzelnen Fraktionen wurde nun definiert durch ihren Abstand von der Fraktion $u_{app} = 0$.

Dieser Abstand war für jede Fraktion durch die Anordnung der Absaugschläuche am Boden der Trennkammer gegeben.

Ferner wurden Kontrollen mit Ratten-Erythrozyten über ein

direkt an die Trennkammer angeschlossenes optisches System durchgeführt. Die durch die beiden Methoden erhaltenen Werte ergaben gute Übereinstimmung.

Lymphknoten-Zellen fanden sich in 15 Fraktionen, wobei sich die elektrophoretische Beweglichkeit zwischen -2,16 und -3,41 (umxcm/Vxsec) bewegte. Der Unterschied zweier Fraktionen wurde mit u_{app} = -0,088 (µmxcm/Vxsec) bestimmt.

II. 4. Die elektrophoretischen Verteilungsprofile anti-Peroxidase-bildender Zellen

II. 4.1. Anfertigung von Zytozentrifugenpräparaten.

Die quantitative Auszählung von Anti-Peroxidase-bildenden Zellen in Zellausstrichen, die nach konventionellen Techniken hergestellt werden, bedingt wegen der hohen Verdünnung der spezifischen Zellen in den Suspensionen einem enormen Arbeitsaufwand. Um eine höhere Zellzahl pro Flächeneinheit zu erzielen, verwendeten wir von ROBERT LEIF entwickelte Zytozentrifugationsmethode (15). Die Zellen der zu untersuchenden Elektrophoresefraktionen wurden auf normale, mit Edinosit entfettete Objektträger zentrifugiert (Imprint). Zu diesem Zweck wurde ein in Abb. 1 dargestelltes Gerät gebaut. Der Objektträgerbehälter besteht aus einem U-förmigen Metallträger, der frei beweglich am Rotorkopf einer Christ-Kühlzentrifuge befestigt ist. Auf die Grundplatte von der Größe eines Objektträgers wird der entfettete Objektträger

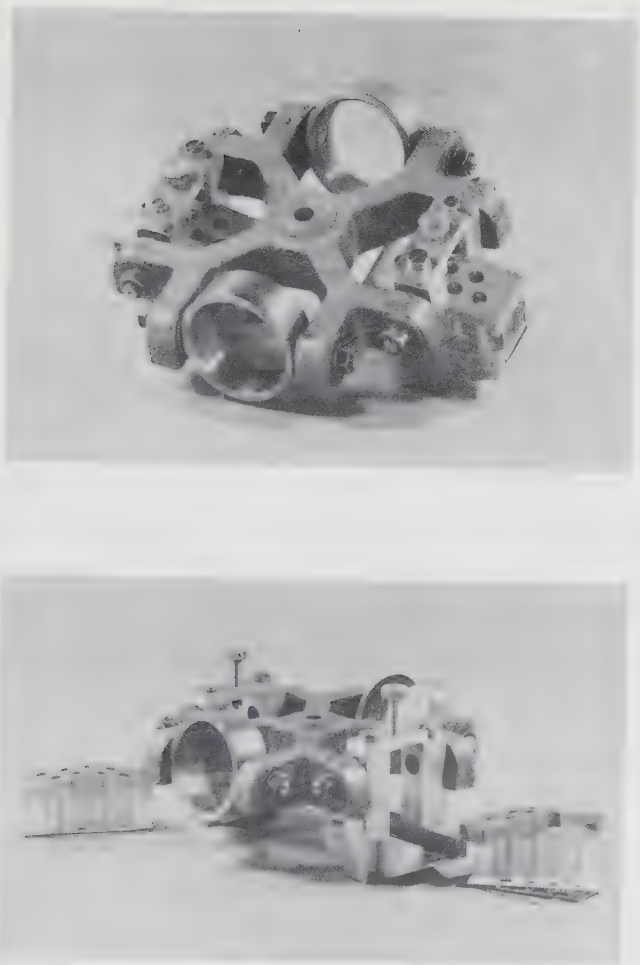


Abb. 1 Zytozentrifuge nach ROBERT LEIF (15)

gelegt, darauf ein gleichgroßer Filterkarton (Schleicher & Schüll), eine entsprechende Gummidichtung und ein Kunststoffblock mit einer Schraubklemme befestigt. Die auf dem Objektträger befestigten Teile weisen 8 zylindrische Bohrungen auf mit je 50,24 mm^2 Grundfläche, in die jeweils 0,6 ml Zellsuspension (5 x 10^5 Zellen/ml) eingefüllt werden. Mit dieser Anordnung können 8 verschiedene Proben gleichzeitig auf einen Objektträger zentrifugiert werden. Die Zellen werden 15 Min. bei 100 x g zentrifugiert. Anschließend wird zwischen Kunststoffblock und Metallkappe ein nicht perforierter, mit 3,8 % Glutaraldehyd befeuchteter Filterkarton (Schleicher & Schüll) gespannt und die darüber liegenden Kanäle der Kappe mit ca. 0,3 ml 3,8 % Glutaraldehyd gefüllt. Darauf wird erneut 15 Min. bei 60 x g zentrifugiert.

Durch diese Anordnung wird das Fixiermittel erst während der Beschleunigung durch das Filter gedrückt, so daß die Zellen erst dann fixiert werden, nachdem sie bereits auf der Oberfläche des Objektträgers haften. Dadurch werden die Zellen nicht aus ihrer Position, die sie beim ersten Zentrifugieren erhalten haben, gebracht. Außerdem werden die Zellen in abgeflachtem Zustand fixiert, was die morphologische Differenzierung erleichtert. Eine bei der Ausstrichtechnik übliche Lufttrocknung, die ebenfalls eine Abflachung der Zellen bewirkt, wird bei der vorliegenden Technik möglichst vermieden, da sie bei den Zytozentrifugaten eventuell zu einer Aggregation der Zellen auf den Objektträgern führen kann. Bei der von uns angegebenen Technik bleiben alle Zellen einzeln auf den Objektträgern liegen.

Die morphologische (lichtmikroskopische) Klassifizierung derZellen in den getrennten Fraktionen erfolgte nach Pappenheim's panchromatischer Färbung. In diesem Fall wurden jedoch die Zytozentrifugate nicht mit Glutaraldehyd fixiert, sondern entweder nur im kaltem Luftstrom getrocknet oder mit Methylalkohol fixiert.

II. 4.2. Inkubation mit Antigen

Nach dem Zentrifugieren wurden die Zytozentrifugate 10 Min. mit 3,8 %igem Glutaraldehyd nachfixiert und anschließend 3 x 10 Min. in PBS gewaschen. Die Inkubation erfolgte in einer 0,1 %igen Peroxidase-Lösung in PBS für 60 Min. Das Überflüssige (nicht gebundene) Antigen wurde durch dreimaliges Waschen in PBS (jeweils 5 Min.) entfernt. Dann erfolgte eine Nachfixierung in 25 %igem Methylalkohol für 8 Min., um die Antikörper-Ag Komplexe beständig zu machen und die Aktivität der endogenen Peroxidase abzuschwächen.

II. 4.3. Histochemischer Peroxidase- Nachweis

Der histochemische Nachweis des gebundenen Enzyms erfolgte nach Gömöri (16).

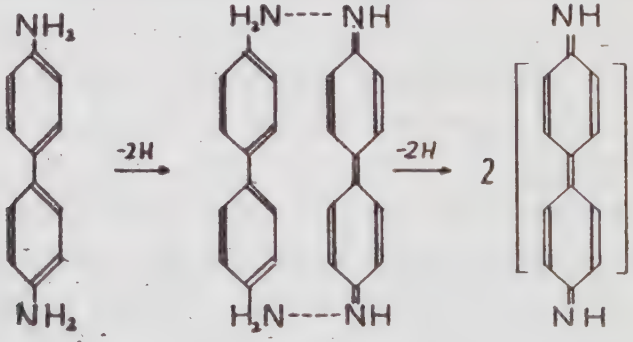
Folgende Lösungen wurden verwendet:

Lösung A: 95 % Äthanol, 100 ml
0,25 g Benzidin
10 % Nitroprussidnatrium, 5,0 ml
0,2 M Acetat-Puffer, pH 4,5; 5,0 ml

Lösung B: Lösung A 50 ml + 30%-ige H_2O_2 0,1 ml

Die Präparate wurden mit 1,5 ml Lösung A überschichtet. Nach 1Min wurden 2 Tropfen Lösung B zugefügt und durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Nach kurzem Abspülen mit destilliertem Wasser wurde weitere 5 Min. unter fließendem Wasser nachgespült. Die Gegenfärbung erfolgte mit 1 %igem Kernechtrot (15 Min). Nach nochmaligem Waschen in fließendem Wasser konnten die Präparate getrocknet und lichtmikroskopisch betrachtet werden. Die Peroxidase-enthaltenden Zellen sind leuchtend blau, der Zellkern bleibt meistens ausgespart. (Abb.2

Die Oxidation des Benzidins verläuft normalerweise über ein unstabiles, blaues Zwischenprodukt zum stabilen, braunen Endprodukt.(17)



Benzidin "Benzidinblau" "Benzidinbraun"

Bei Einhaltung gewisser Bedingungen (pH, Salzkonzentration,usw.) gelingt es das blaue Zwischenprodukt zu stabilisieren und eine Weiter-Oxidation zum braunen Endprodukt zu vermeiden. Als zuverlässigste Methode hat sich die obengenannte von Gömöri erwiesen. Das blaue Reaktionsprodukt (siehe schematischen Reaktionsablauf) ist unlöslich und über Jahren beständig.

Die Pappenheimfärbung wurde nach den üblichen Standardmethoden durchgeführt.

Eine schematische Darstellung der beschriebenen Arbeitsgänge ist aus Abb. 3 ersichtlich.

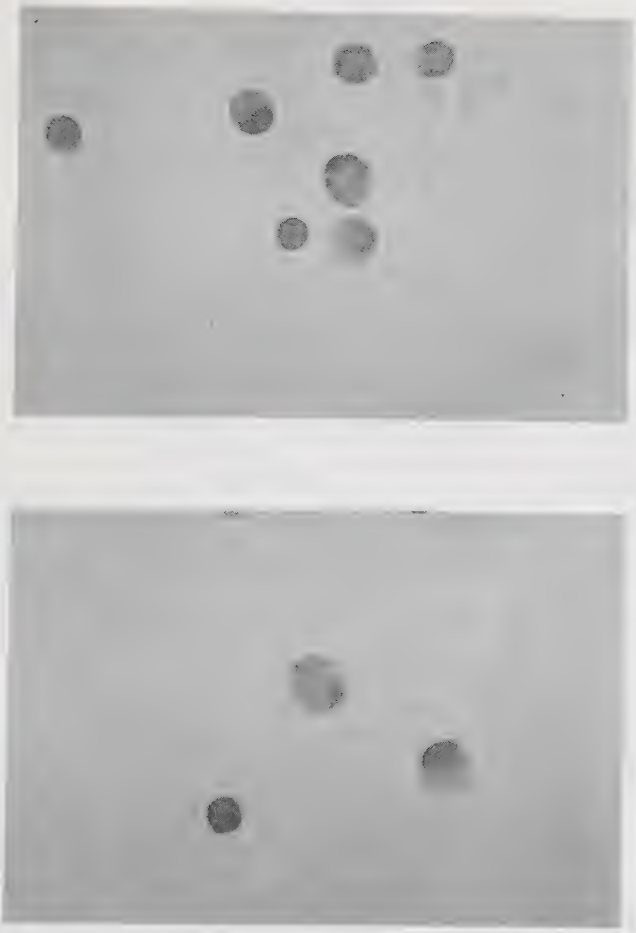


Abb. 2 Anti-Peroxidase-Antikörper enthaltende lymphatische Zellen aus elektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen gewonnenen Zytozentrifugaten.

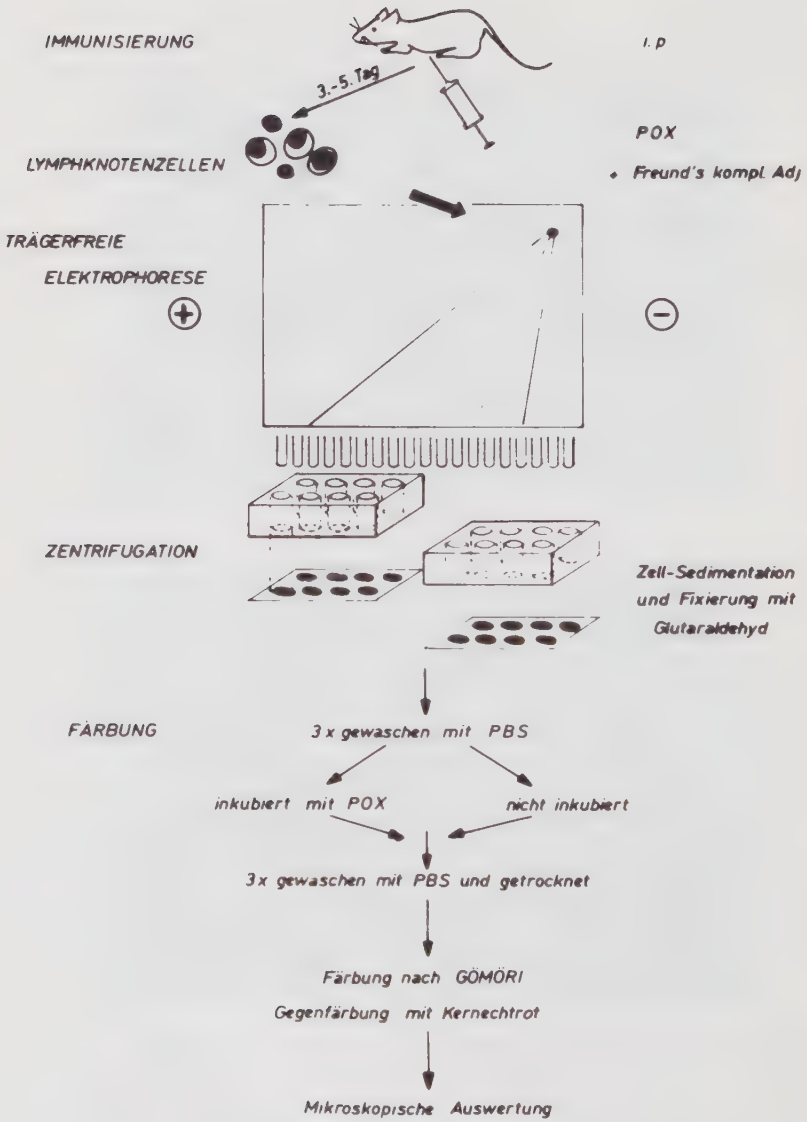


Abb. 3 Schematische Darstellung der Arbeitsgänge

II. 4.4. Auswertung der Präparate

Zur Abgrenzung der endogenen und exogenen (antigenen) Peroxidase wurden folgende in vitro Versuche durchgeführt:

I. Inkubation immunisierter, elektrophoretisch getrennter Zellen in Peroxidase-Lösung

II. Inkubation entsprechender Zellen in TC-Lösungen ohne Peroxidase

III. Peroxidase-Inkubation von Lymphzellen, die mit anderen Antigenen immunisiert wurden (Freund's Adj. oder SRBC)

IV. Peroxidase-Inkubation von Lymphzellen unbehandelter Tiere.

Die einzelnen Zytozentrifugate wurden mikroskopisch ausgewertet und der Prozentsatz Peroxidase-positiver Zellen in Kontrolle II von Kontrolle I subtrahiert. Die Ansätze III und IV dienten zum Ausschluß von Kreuzreaktionen oder von unspezifischen Farbreaktionen. Überstieg der Prozentsatz der Peroxidase-positiven Zellen in Ansatz III und IV statistisch signifikant den Prozentsatz in Ansatz II, so wurde der gesamte Versuch verworfen. Die Zytozentrifugate wurden folgendermaßen ausgezählt:
Um die genaue Zellzahl pro Imprint zu erhalten, wurden 20-40 Meßquadrate (Fläche 0,04 mm^2) ausgezählt und aus dem Mittelwert die Zellzahl auf der Fläche des gesamten Imprints geschätzt. Bei schwächerer Vergrößerung wurden dann die Peroxidase-positiven Zellen pro Imprint ausgezählt und zu der

Gesamtzellzahl in Beziehung gesetzt. Aus dieser Relation wurde die Konzentration der anti-Peroxidase-Antikörperbildenden Zellen in den elektrophoretisch getrennten Fraktionen ermittelt.

In den nach Pappenheim gefärbten Präparaten wurden 1000 Zellen pro Fraktion ausgewertet.

II. 5. Standardisierung und statistische Auswertung

Die Gesamtzahl der kernhaltigen Zellen in allen elektrophoretischen Fraktionen wurde gleich 100 % gesetzt und die entsprechenden Anteile der einzelnen Zellsorten in den einzelnen Fraktionen darauf bezogen. Die erhaltenen Werte wurden statistisch mit Hilfe des Student-Tests und des χ^2-Tests analysiert. Zur Errechnung der angepaßten Wahrscheinlichkeitsdichte der gruppierten Verteilungen und der Prüfung auf Nichtnormalität mit dem χ^2-Test wurden die Tafeln nach FISHER und YATES verwendet (18).

III. Ergebnisse

III. 1. Prüfung der zufälligen Verteilung der kernhaltigen Zellen auf dem Zytozentrifugenimprint

Zur Ermittlung der Gesamtzellzahl auf einem Imprint (50,24 mm^2) durch Hochrechnung aus wenigen Flächeneinheiten zu 0,1 mm^2, müssen folgende Bedingungen erfüllt sein:

a) Es darf kein signifikanter Unterschied der Zelldichte pro Flächeneinheit (0,1 mm^2) an verschiedenen Punkten

des gesamten Imprints (50,24 mm^2) bestehen.

b) lineare Regressionsfunktion der Beziehung: Anzahl der zentrifugierten Zellen / Zellzahl auf den Imprints.

c) Zufälligkeit der Verteilung bestimmter Zelltypen auf dem Imprint adaequat zu der Verteilung in der zentrifugierten Zellsuspension.

Entsprechende Untersuchungen wurden mit Knochenmarkzellen und Lymphknotenzellen der Ratte durchgeführt.

ad a) Die Imprints wurden in 4 Quadrate eingeteilt und in jedem Quadrat die kernhaltigen Zellen von 4 - 5 Flächeneinheiten (0,1 mm^2), zufällig verstreut über den Quadraten, ausgezählt. Pro Imprint wurden 18 Flächeneinheiten ausgewertet und aus den Werten von je 5 Imprints die geometrischen Mittelwerte und Varianzen der Zellzahl / Fläche berechnet. Aus Abb. 4a geht hervor, daß bei kernhaltigen Knochenmarkzellen keine signifikanten Unterschiede der Gesamtvarianz ($2P = 0,001$) in einem Bereich zwischen $0,1 \times 10^6$ Zellen / Zentrifugat und $1,2 \times 10^6$ Zellen / Zentrifugat bestehen. Bei Werten unter $0,05 \times 10^5$ Zellen / Zentrifugat kam es zu einer Erhöhung der Streuung, die auf die geringe Zellfrequenz in den untersuchten Flächeneinheiten zurückzuführen ist.

ad b) Die Prüfung der Regressionsfunktion ergab eine linear steigende Abhängigkeit der Zellkonzentration in der Zellsuspension zur Zellkonzentration auf dem Imprint

(Abb. 4b). Aus den vorliegenden Daten war zu schliessen, daß sich durch Auszählung weniger Flächeneinheiten die Gesamtzellzahl des Imprints mit genügender Genauigkeit ermitteln läßt.

ad c) Um die Zufälligkeit der Verteilung verschiedener Zellsorten im Imprint zu prüfen, wurden Knochenmark- und Milzzellsuspensionen untersucht. 0,2 x 10^6 Zellen wurden auf Objektträger zentrifugiert und aus denselben Stammsuspensionen konventionelle Ausstriche gefertigt.

In Abb. 5 sind die Ergebnisse dieser Experimente mit nach Pappenheim gefärbten Präparaten zusammengestellt. In den Ausstrichen wurden jeweils 1000 Zellen und in den Imprints 80 Flächeneinheiten (0,1 mm^2), die zufällig über das Imprint verteilt waren, differenziert. Die angegebenen Daten stammen von jeweils 4 verschiedenen Objektträgern. Ein Vergleich der Mittelwerte und der mittleren quadratischen Abweichungen zeigt bis auf die lymphoiden Zellen und Erythroblasten sehr geringe Unterschiede. Die Unterschiede in den letzten Zellklassen sind darauf zurückzuführen, daß offensichtlich Lymphozyten mit Normoblasten beim mikroskopischen Auswerten verwechselt werden können.
Die hohe mittlere quadratische Abweichung bei den Ausstrichpräparaten spricht dafür, da hier die Wahrscheinlichkeit einer biasfreien Schätzung der zufälligen Verteilung a priori eher gegeben ist. Ähnliche geringe Unterschiede zwischen Ausstrichpräparaten und Zytozentrifugaten wurden auch mit

Milzzellsuspensionen erhalten (Abb. 6).
In weiteren Versuchen wurde in ähnlicher Weise die Verteilung von Zellen mit endogener und exogener POX (antikörperbildende Zellen) im Zytozentrifugatimprint mit entsprechenden Ausstrichen verglichen.
In Abb. 7 wurden zwei verschiedene Proben von Rattenknochenmarkzellen auf Objektträger zentrifugiert und POX gefärbt. In 8 verschiedenen Imprints und Ausstrichen pro Probe wurde das Verhältnis der POX-positiven zu den negativen Zellen bestimmt. Die Mittelwerte aus Imprints einerseits und Ausstrichen andererseits zeigten keine signifikanten Unterschiede. In den Imprints waren lediglich die mittleren quadratischen Abweichungen halb so groß wie bei den Ausstrichpräparaten.

Ein weiterer Test wurde durchgeführt mit Anti-POX-bildenden Zellen (Abb. 8). Vier verschiedene Proben von antikörperbildenden Zellen enthaltenden Fraktionen wurden abzentrifugiert und die Gesamtzahl der anti-POX-bildenden Zellen in 8 Imprints auf verschiedenen Objektträgern bestimmt. Die im Gegensatz zu den anderen Untersuchungen relativ hohen quadratischen Abweichungen lassen sich auf die geringe Frequenz der spezifischen antikörperbildenden Zellen zurückführen. Da jedoch die einzelnen Abweichungen untereinander eine zu vernachlässigende Variabilität (signifikant für 2P = 0,1 im Fisher-Test) zeigen, können die einzelnen Mittelwerte miteinander verglichen werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die von uns modifizier-

te Methode der Zytozentrifugation der Ausstrichtechnik qualitativ vergleichbare Ergebnisse bringt. Der zur Bestimmung von Konzentrationen extrem verdünnter Zellen benötigte Zeitaufwand ist dagegen bei der Zytozentrifuge im Vergleich zur konventionellen Ausstrichmethode verschwindend gering.

Gesamtzahl der Zellen pro zentrifugierter Probe	Gesamtzahl der kernhaltigen Zellen pro Flächeneinheit ($0{,}1mm^2$)	
	log GM	Varianz S^2
0.05×10^6	1.022	0.0190
$0{,}1 \times 10^6$	1.408	0.0056
0.2×10^6	1.521	0.0058
0.4×10^6	1.777	0.0051
0.8×10^6	2.003	0.0060
1.2×10^6	2.202	0.0048
mittlerer prozentualer Anteil der wiedergefundenen Zellen	15.9	0.924

Abb. 4a: Verteilung kernhaltiger Zellen in Zytozentrifugat-Imprints. Mäuse-Knochenmark-Zellsuspensionen verschiedener Konzentrationen wurden auf Objektträger zentrifugiert und die Gesamtzahl der kernhaltigen Zellen pro Flächeneinheit ($0{,}1mm^2$) ausgezählt. Von jeweils fünf Parallelbestimmungen wurde das geometrische Mittel und die Varianz aus je 18 Flächeneinheiten ermittelt.

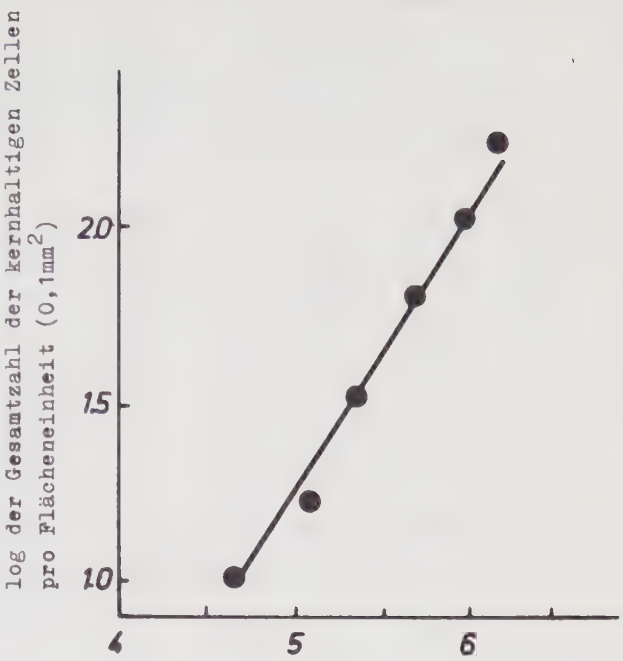


Abb. 4b: log der Gesamtzahl der Zellen pro zentrifugierter Probe

	Zytozentrifuge		Ausstrich	
	Mittelwert	Varianz	Mittelwert	Varianz
Erythroide Zellen	30.6	3.20	21.0	141.00
Myeloide Zellen	10.4	0.09	11.2	0.04
Eosinophile	3.6	0.05	5.0	0.80
Neutrophile	41.5	6.70	42.0	16.00
Lymphocyten	10.9	0.04	16.1	37.00
Gewebsmastzellen	0.3	0.02	0.1	0.02
Monozyten	1.1	0.36	3.8	0.80
Plasmazellen	1.4	0.04	0.8	0.25
Megakaryozyten	0.2	0.02	--	--

Abb. 5: Vergleich von mittels Zytozentrifuge und konventionellen Ausstrichen hergestellten Zytogrammen bei Ratten-Knochenmark-Zellsuspensionen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von 80 Flächeneinheiten ($0{,}1mm^2$), zufällig ausgewählt aus vier verschiedenen Zytozentrifugaten. Die Daten der Ausstriche sind Mittelwerte der Auszählung von vier Präparaten. Es wurden $5x10^3$ Zellen differenziert.

	Zytozentrifuge		Ausstrich	
	Mittelwert	Varianz	Mittelwert	Varianz
Lymphozyten	97.2	0.45	94.5	10.3
Plasmazellen	1.0	0.04	0.6	0.03
Blasten	0.28	0.07	0.3	0.12
Monozyten	0.48	0.05	1.2	0.2
Granulozyten	1.04	0.14	3.4	2.3

Abb. 6: Vergleich von mittels Zytozentrifuge und konventionellen Ausstrichen hergestellten Zytogrammen bei Ratten-Milz-Zellsuspensionen. Die Bedingungen der Auswertung sind die gleichen wie bei Abb. 3.

Zytozentrifugate	Gesamtzahl der zentrifugierten kernhaltigen Zellen	endogene Peroxydase (POX)	Mittelwert	Varianz
	0.5×10^6	POX pos POX neg	47.7 52.3	5.9
	1.0×10^6	POX pos POX neg	49.0 51.0	6.4
Ausstriche		POX pos POX neg	50.5 49.5	11.8

Abb. 7: Vergleich der Konzentration von endogenen Peroxydase-haltigen Zellen aus Ratten-Knochenmark-Zellsuspension in Zytozentrifugaten und in Ausstrichen.

Stichprobe	Gesamtzahl der anti-Peroxydase antikörperbildenden Zellen pro Zytozentrifugat-Imprint					
	Objektträger-Nummer				Mittelwert	s^2
	I	II	III	IV		
1	45	52	43	49	47.2	22.5
2	56	60	52	61	57.2	24.5
3	52	42	50	48	48.0	18.6
4	64	58	66	56	61.0	22.6

Abb. 8: Verteilung von anti-POX Antikörper-bildenden Zellen in Zytozentrifugat-Imprints. Die verschiedenen Proben stammen von elektrophoretisch getrennten Fraktionen von mit POX immunisierten Lymphknoten-Zellen der Ratte. $0{,}5 \times 10^6$ Zellen wurden zentrifugiert.

III. 2. Prüfung der elektrophoretischen Verteilung von Lymphknotenzellen und Plasmazellen sowie Blasten nach Immunsierung mit POX

Lymphknotenzellen wurden beginnend mit der 72. Stunde nach Immunisierung mit POX und Freund's Adjuvant (komplett) in 12 - stündigem Abstand elektrophoretisch aufgetrennt. Die im Gesamtverteilungsprofil enthaltenen Frequenzen der POX-positiven Lymphozyten, Blasten und Plasmazellen, sowie die der ebenfalls zu beobachtenden entsprechenden unspezifischen Zellformen wurden mikroskopisch bestimmt. Aus den diskreten Verteilungskurven wurden mit Hilfe der Mittelwerte und der Varianzen über die Argumente c die angepaßten Normalverteilungskurven berechnet. In Abb. 9 - 13 sind die tatsächlichen Zellfrequenzen und die angepaßten Verteilungskurven dargestellt. Um zu Prüfen, ob die tatsächlichen Verteilungen der einzelnen Zellsorten zufällige Schätzwerte aus homogenen Grundgesamtheiten darstellen, wurden die gemessenen Werte mit den angepaßten Werten mit Hilfe des χ^2-Tests verglichen.

In allen Versuchen wurden die Lymphknotenzellen (95 - 98 % lymphoide Zellen) in einem elektrophoretischen Beweglichkeitsbereich von 2,16 bis 3,41 µmxcm/Vsec gefunden. Rattenlymphozyten höherer und geringerer EPM sind nicht nachweisbar (4, 13).

III. 2.1.

Elektrophoretische Zellverteilung 72 Stunden nach Immunisierung

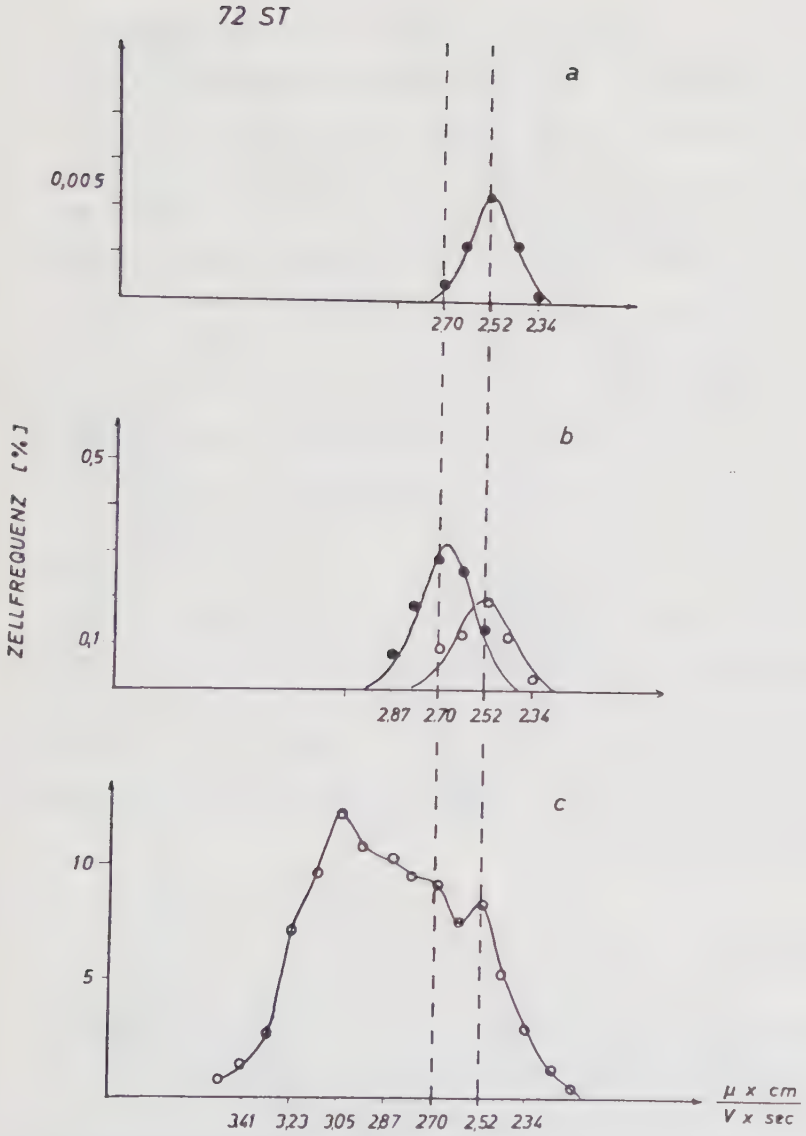


Abb. 9 Elektrophoretische Trennprofile von Lymphknoten-Zellen 72 Stunden nach Immunisierung mit POX

9 a. anti-POX produzierende Zellen /Σ kernhaltiger Zellen= 100%/

9 b. Blast- und Plasmazellen /Σ kernhaltiger Zellen= 100%/

9 c. kernhaltige Zellen

mit POX.

Abb. 9c zeigt die elektrophoretische Zellverteilungskurve einer LK-Suspension 72 Stunden nach Immunisierung mit POX. Sie ist identisch mit der Gesamtverteilungskurve von nicht immunisierten LK-Zellen. Nach mikroskopischer Aufschlüsselung der morphologischen Zelltypen finden sich in einem Beweglichkeitsbereich von 2,87 bis 2,34 µmxcm/Vsec Plasmazellen und Blasten (Abb. 9b). Beide Zellarten können auch ihrer Beweglichkeit nach voneinander unterschieden werden. Plasmazellen wandern in einem Bereich von 2,87 bis 2,43 µmxcm/Vsec mit einem Median von 2,7 µmxcm/Vsec, während Blasten in einem Bereich von 2,7 bis 2,34 µmxcm/Vsec mit einem Median von 2,52 µmxcm/Vsec wandern. Aus den χ^2-Werten ist zu entnehmen, daß die Schätzungen der Verteilung beider Zellsorten aus zwei verschiedenen normal verteilten Grundgesamtheiten entstammen. Die Identifizierung der anti-POX-positiven Zellen zeigte, daß diese lediglich in einem Bereich von 2,7 bis 2,34 µmxcm/Vsec mit einem Median von 2,52 µmxcm/Vsec gefunden werden (Abb. 9a). Dieser Beweglichkeitsbereich ist mit dem der Blasten identisch.

III. 2.2.

Elektrophoretische Zellverteilung 84 Stunden nach Immunisierung mit POX.

12 Stunden später zeigt die Gesamtverteilungskurve eine Zunahme der Gesamtzellfrequenz im langsamen elektrophoretischen Beweglichkeitsbereich (Abb. 10c) und eine Zunahme der Plas-

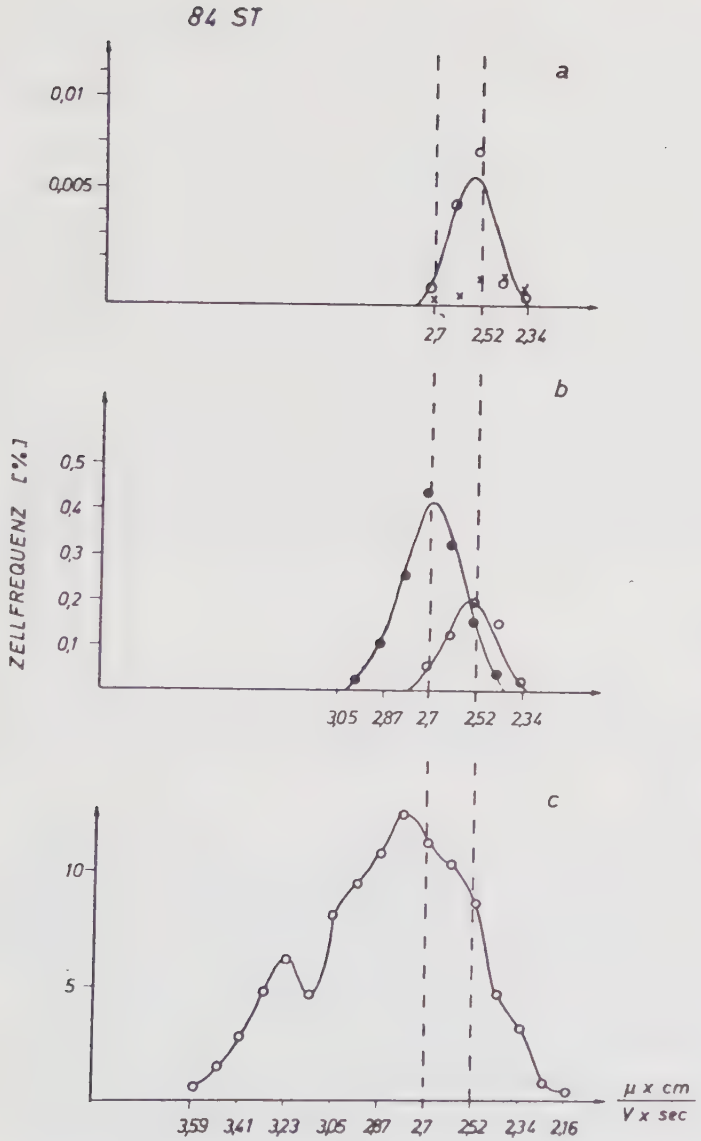


Abb. 10 Elektrophoretische Trennprofile von Lymphknoten-Zellen 84 Stunden nach Immunisierung mit POX

10 a. anti-POX produzierende Zellen /Σ kernhaltiger Zellen= 100%/

10 b. Blast- und Plasmazellen /Σ kernhaltiger Zellen= 100%/

10 c. kernhaltige Zellen

mazellen und Blasten (Abb. 10b). Entsprechend den χ^2-Werten waren beide Zellformen Plasmazellen P (χ^2 = 0.33;d.f.4) = 0,99; Blasten P (χ^2= 1.6;d.f.3) = 0,8 normal verteilt. Die Zellvereilungsklassen waren identisch mit denen, die 12 Stunden zuvor erhalten wurden. Anti-POX-positive Zellen konnten wiederum nur in einem Beweglichkeitsbereich von 2,7 bis 2,34 µmxcm/Vsec mit einem Median von 2,52 µmxcm/Vsec beobachtet werden (Abb. 10a). Die morphologische Aufschlüsselung der POX-positiven Zellen führte zu einer Differenzierung zwischen positiven Lymphozyten und blastenähnlichen Zellen. Beweglichkeitsbereich und Median beider Zellsorten schienen sich zu decken, obwohl infolge der geringen Zellfrequenz der Nachweis der Normalverteilung nicht geführt werden konnte.

III. 2.3.

Elektrophoretische Zellverteilung 96 Stunden nach Immunisierung mit POX

Die Gesamtverteilungskurve der kernhaltigen Zellen zeigte eine weitere starke Zunahme im Bereich langsamer elektrophoretischer Beweglichkeit (Abb. 11c). Die morphologische Differenzierung der getrennten Fraktionen nach Pappenheim ergab für die Gesamtheit der Blasten und Plasmazellen dieselbe elektrophoretische Beweglichkeit (Abb. 11b) wie in den vorhergegangenen Untersuchungen (72 und 84 Stunden nach Immunisierung, vgl. Abb. 9b und 10b). Das Profil der anti-POX-positiven Zellen zeigte eine zweigipfelige Verteilung im Bereich zwischen 2,87 und 2,34 µmxcm/Vsec mit Medianen

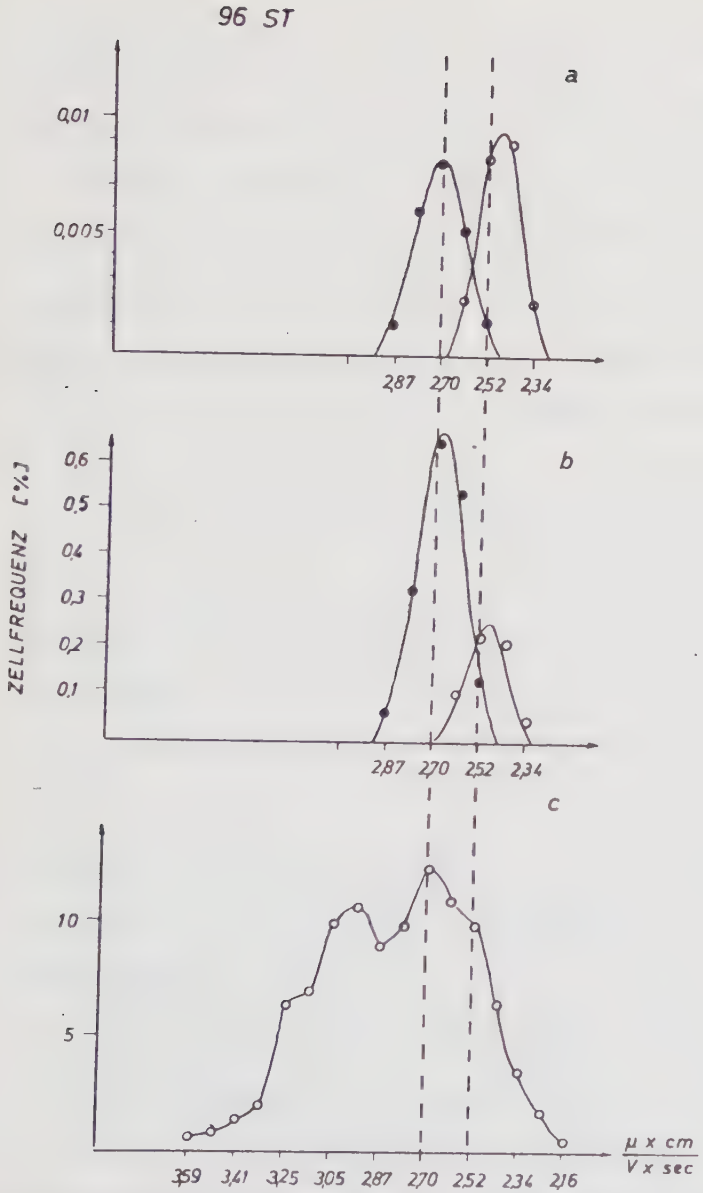


Abb. 11 Elektrophoretische Trennprofile von Lymphknoten-Zellen 96 Stunden nach Immunisierung mit POX

11 a. anti-POX produzierende Blast- und Plasmazellen / Σ kernhaltiger Zellen= 100%/

11 b. Blast- und Plasmazellen / Σ kernhaltiger Zellen= 100%/

11 c. kernhaltige Zellen

bei 2,70 und 2,43 µmxcm/Vsec (Abb. 11a). Da die Frequenz der ausgezählten Meßwerte ziemlich groß war (die antikörperbildenden Zellen wurden in einer Population von 2 - 3 x 10^5 Zellen ausgezählt; siehe Material und Methode), kommt den Meßwerten hohe Signifikanz zu. Es ist anzunehmen, daß die zweigipfelige Verteilungskurve der spezifischen antikörperbildenden Zellen durch zwei sich überlappende Normalverteilungen zustande kommt. Diese Vermutung wurde sowohl statistisch als auch durch die morphologische Aufschlüsselung bestätigt. Die Berechnung der χ^2-Werte zeigte für die Gesamtkurve $P\ (\chi^2 = 38; d.f.5\ ) < 0.0005$ hochsignifikant eine nicht normal verteilte Grundpopulation.

Nach der morphologischen Auswertung der mit Benzidin und Kernechtrot gefärbten Präparate konnten die anti-POX-positiven Zellen im elektrophoretischen Bereich zwischen 2,61 und 2,34 µmxcm/Vsec $P\ (\chi^2 = 0,47; d.f.2\ ) > 0,75$ mit einem Median bei 2,43 µmxcm/Vsec wie zu 72 Stunden und 84 Stunden als Blasten $P\ (\chi^2 = 0,35; d.f.2\ ) > 0,8$ identifiziert werden. Die andere Population antikörperbildender Zellen zwischen 2,96 und 2,43 µmxcm/Vsec mit einem Median bei 2,7 µmxcm/Vsec $P\ (\chi^2 = 4; d.f.2\ ) > 0,2$, die erstmals zu diesem Zeitpunkt beobachtet war, bestand hauptsächlich aus unreifen Plasmazellen $P\ (\chi^2 = 1.41; d.f.2\ ) = 0,5$. Entsprechend der χ^2-Werte erschienen beide Populationen normalverteilt.

III. 2.4.

Elektrophoretische Zellverteilung 108 Stunden nach Immunisierung mit POX.

Die Gesamtverteilungskurve aller kernhaltigen Zellen zeigte nun das für immunisierte Lymphknoten charakteristische elektrophoretische Verteilungsmuster, d. h. eine maximale Zunahme der Zellen im Bereich langsamer elektrophoretischer Beweglichkeit (Abb. 12c).

Die anti-POX-positiven Zellen befinden sich in denselben EPM-Bereichen wie bisher (Abb.12a). Die Zellfrequenzen der vor 12 Stunden beobachteten zweigipfeligen Kurve hatten sich stark verändert: der erste Gipfel im schnelleren Beweglichkeitsbereich war etwa auf das vierfache angewachsen, wobei der Gipfel im langsameren Bereich nur noch als Schulter vorhanden war.

Auch die morphologische Differenzierung der antikörperbildenden Zellen zeigte zwei Subpopulationen auf: aktive Blasten und blastenähnliche Zellen im elektrophoretischen Bereich zwischen 2,7 und 2,34 µmxcm/Vsec mit einem Median bei 2,52 µmxcm/Vsec. Die Frequenz dieser Zellen zeigte eine abnehmende Tendenz im Vergleich zu dem Wert vor 12 Stunden. Die andere Subpopulation, die ausaktiven Plasmazellen bestand, war zwei Fraktionen zur anode verschoben zu finden. Diese Klassenverteilung war auch in den vorangehenden Beobachtungen für aktive und inaktive Plasmazellen charakteristisch. Die Frequenz der aktiven Plasmazellen (Median bei 2,7 µm-

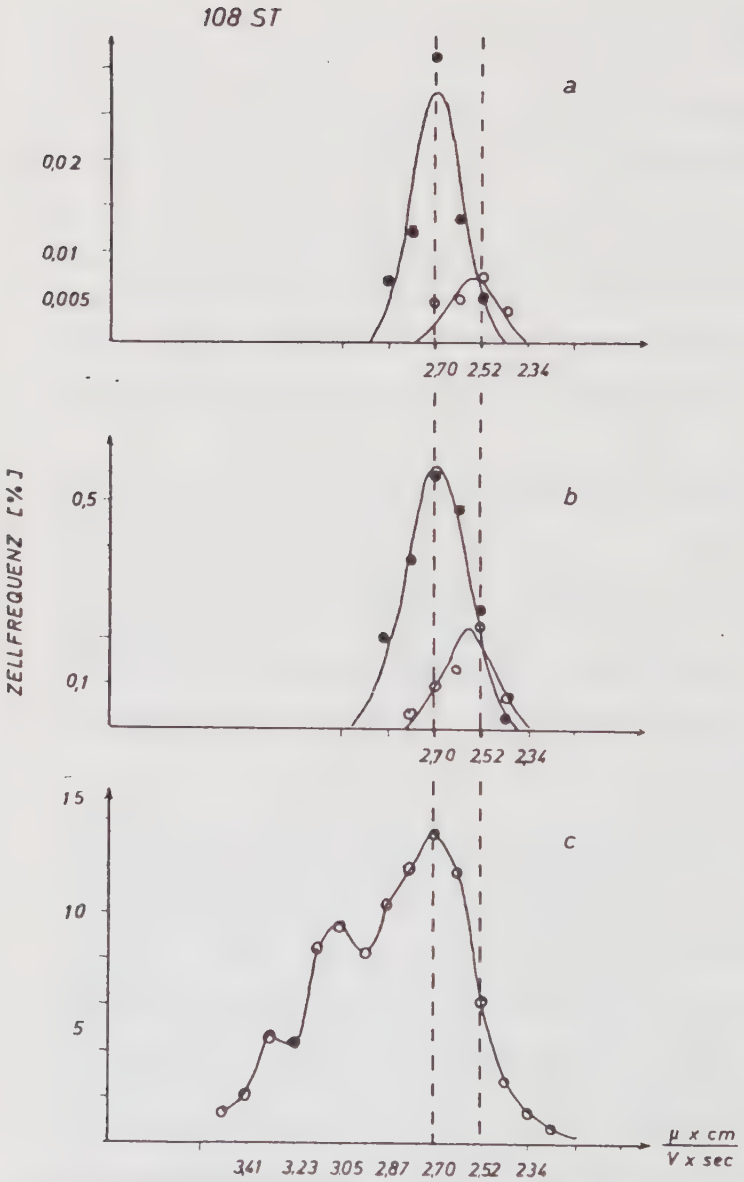


Abb. 12 Elektrophoretische Trennprofile von Lymphknoten-Zellen 108 Stunden nach Immunisierung mit POX

12 a. anti-POX produzierende Blast- und Plasmazellen / Σ kernhaltiger Zellen= 100%/

12 b. Blast- und Plasmazellen / Σ kernhaltiger Zellen= 100%/

12c. kernhaltige Zellen

xcm/Vsec) war etwa vierfach höher als vor 12 Stunden. Die morphologische Auswertung aller Blasten und Plasmazellen nach Pappenheim's Färbung bestätigte die elektrophoretischen Beweglichkeitsbereiche der spezifischen antikörperbildenden Zellen, während die Frequenz der Zellklassen jedoch ca. 10-fach höher lag.(Abb. 12 b).

Zwischen der Frequenz der POX-positiven schnell wandernden Plasmazellen und der Frequenz der Gesamtzahl der Plasmazellen konnte im zeitlichen Ablauf ein Unterschied beobachtet werden. Die Gesamtplasmazellen erreichten ihre höchste Frequenz bereits nach 96 Stunden während die spezifischen Plasmazellen erst ihre höchste Frequenz bei 108 Stunden erreichten. Diese Diskrepanz äußerte sich in dem Abfall der zellulären Antwort. 120 Stunden nach Immunisierung war die Zahl der spezifischen Plasmazellen rapide vermindert, während die Zahl der unspezifischen Plasmazellen unverändert hoch blieb.

III. 2.5.

Elektrophoretische Zellverteilung 120 Stunden nach Immunisierung mit POX.

Die Gesamtverteilungskurve aller kernhaltigen LK-Zellen wird zu diesem Zeitpunkt der Verteilung unimmunisierter Lymphknotenzellen wieder ähnlich (Abb. 13c).

Die anti-POX-positiven Zellen waren ausschließlich im Wanderungsbereich zwischen 2,52, und 2,87 µmxcm/Vsec, mit einem

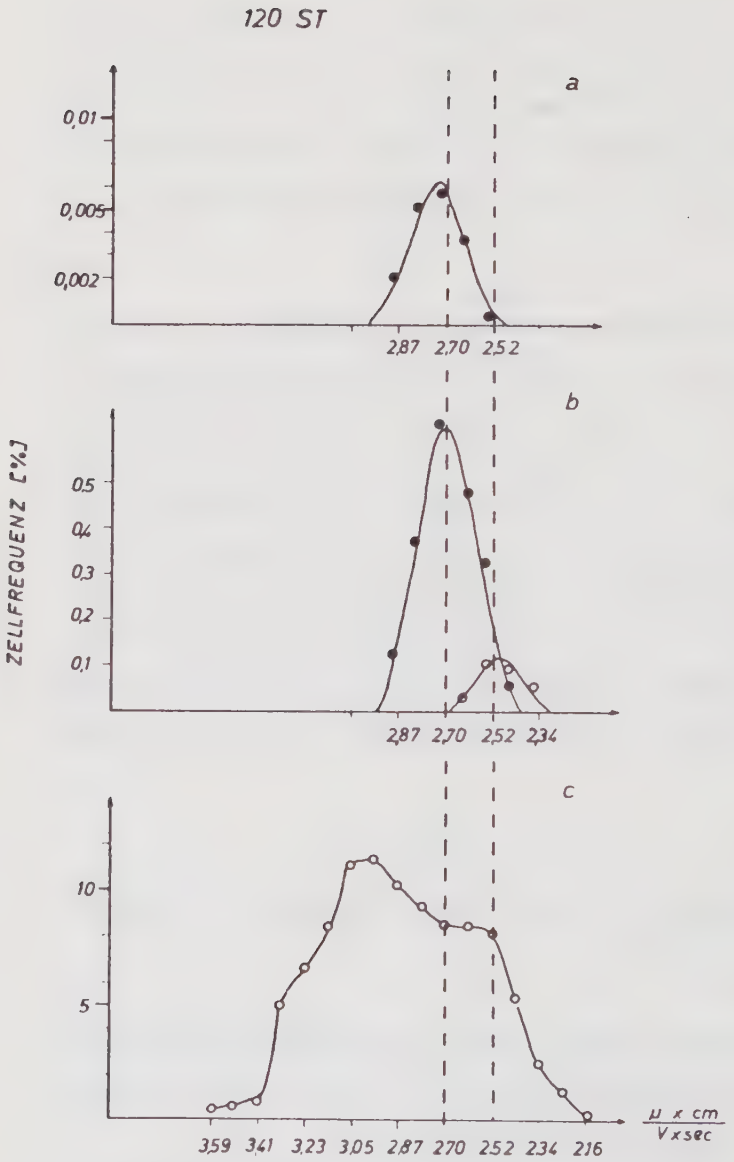


Abb. 13 Elektrophoretische Trennprofile von Lymphknoten- Zellen 120 Stunden nach Immunisierung mit PCX

13 a. anti-PCX produzierende Zellen / Σ kernhaltiger Zellen= 100%/

13 b. Blast- und Plasmazellen / Σ kernhaltiger Zellen= 100%/

13 c. kernhaltige Zellen

Median bei 2,7 µmxcm/Vsec zu finden (Abb. 13a). Morphologisch entsprechen sie reifen Plasmazellen und bieten im Vergleich zu früheren Zeitpunkten ein ungewöhnlich einheitliches Bild in Bezug auf Größe, Aussehen und Kern-Plasma-Verhältnis der Zellen. Aktive Blasten oder kleine Lymphozyten fehlten vollkommen. Die morphologische Auswertung nach Pappenheim zeigte die Blasten in demselben elektrophoretischen Beweglichkeitsbereich wie während des gesamten Versuchsablaufs. Ihre Zahl war bereits stark reduziert, vergleichbar der ersten Beobachtungszeit bei 72 Stunden (Abb. 13b). Die Zahl der gesamten Plasmazellen (aktive und inaktive) war vergleichbar derjenigen bei 108 Stunden, während die Zahl der spezifischen antikörperproduzierenden Plasmazellen stark reduziert war. Die Zusammensetzung der gesamten Plasmazellen gleicher elektrophoretischer Beweglichkeit erschien auch heterogener im Vergleich zu den anti-POX-antikörperproduzierenden Plasmazellen. Neben unreifen und reifen Plasmazellen waren auch ältere Formen (" überreife Plasmazellen ") mit dichter Kernstruktur und verringertem Cytoplasma zu sehen. 12 Stunden später konnten keine anti-POX-positiven Zellen mehr beobachtet werden.

III. 3. 1. Kontrollergebnisse

Bei den drei Kontrollgruppen war nur die endogene POX-Aktivität zu beobachten, welche je nach Färbetechnik variiert (19). Bei der Verwendung von 3,3'-Diaminobenzidin ist das Reaktionsprodukt mittel- bis dunkelbraun. Diese Farbreaktion

kann mit Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten und gelegentlich Makrophagen hervorgerufen werden (20). Die Färbung nach Gömöri (16) mit alkoholischer Benzidin-Lösung dagegen gibt ein leuchtend blaues Reaktionsprodukt. Im Gegensatz zu substituiertem Benzidin bleiben die Erythrozyten ungefärbt. In eosinophilen Leukozyten sieht man tiefblaue, grobe, in neutrophilen Leukozyten schwache, feine Granula. Makrophagen zeigen blaue Einschlüsse, Monozyten bleiben ungefärbt (21). Eine bewährte Methode zur Abgrenzung der endogenen von der exogenen POX-Aktivität ist die selektive Zerstörung der endogenen Enzymaktivität. STRAUS berichtete (22), daß Fixierung der Zellen in absolutem Alkohol oder Gemischen von 4 % Formalin-Alkohol die endogene POX-Aktivität abschwächt. Diese Wirkung des Alkohols wird erheblich verstärkt, wenn man die Präparate zuerst mit Glutaraldehyd fixiert und nachher mit wässriger alkoholischer Lösung behandelt. In diesem Fall wird die endogene POX-Aktivität bis auf einen kleinen Rest in den eosinophilen Leukozyten zerstört.

In eigenen Versuchen hatte sich bewährt, die Präparate nach der Fixation 2 - 3 Tage bei Raumtemperatur aufzubewahren und dann erst mit POX zu inkubieren. Nach dieser Prozedur war endogene POX kaum nachzuweisen. Die Abgrenzung der POX-Reaktion eosinophiler Leukozyten von lymhatischen Zellen, die Ag-Antikörper Komplex enthalten, kann auch in vielen Fällen morphologisch erfolgen. Am genauesten erhält man jedoch die Zahl der spezifisch anti-POX-positiven Zellen durch Subtraktion der werte von nicht POX inkubierten Kontrollpräparaten.

Gelegentlich sah man sowohl in inkubierten wie in nicht inkubierten Präparaten Makrophagen mit POX-positiven Einschlüssen.Mit der hier verwendeten Methode ist es nicht möglich abzuklären, ob es sich bei den Makrophageneinschlüssen um Ag-AK-Komplexe, oder um endogene POX handelt. Auch die Möglichkeit, daß die Makrophagen das für die Immunisierung verabreichte POX enthalten, kann nicht ausgeschlossen werden, obwohl LEDUC (9) 3 Tage nach Immunisierung mit POX in lymphatischem Gewebe kein Ag fand, und STRAUS berichtete (28), daß i.v. injizierte POX nach 72 Stunden nicht mehr in aktiver Form aufzufinden war.

IV. Diskussion

1.1.

Zum Nachweis eines spezifischen Antikörpers in Plasmazellen wurde das von LEDUC und AVRAMEAS beschriebene POX-anti-POX System verwendet (9). In diesem System wird Meerrettich-Peroxidase als Immunogen benützt. Gegen das Trägerprotein des Enzyms werden Antikörper entwickelt, die das Enzym, das die Zellmembran intakter Zellen permieren kann, bei in vitro Inkubation intrazellulär binden. Die prosthetische Gruppe ist mit histochemischen Methoden in der Zelle nachweisbar. Diese vereinfachte Darstellung bedarf bestimmter Ergänzungen.

Die Immunisierung mit POX bewirkt in den Germinalzentren die Bildung eines Spektrums von Antikörpern, die gegen verschiedene Determinanten auf dem Immunogen (POX) gerichtet sind.

Diese Determinanten können sowohl in der Nähe des Coenzyms, als auch an Stellen des Apoenzyms, die im Molekül räumlich weit von der prosthetischen Gruppe entfernt sind, lokalisiert sein (24). Es ist auch vorstellbar, daß Antikörper direkt gegen das Coenzym als haptene Gruppe gerichtet sind. Diese Lokalisation der Antikörperbindungsstellen auf dem Antigen ist für die Nachweisreaktion von großer Wichtigkeit. Antigen-Antikörperreaktionen, die die prosthetische Gruppe selbst betreffen oder in der unmittelbaren Nachbarschaft der prosthetischen Gruppe ablaufen, können die Enzymaktivität empfindlich beeinflussen oder sogar total blockieren. (24) Dieses Phänomen wurde an verschiedenen Versuchsmodellen demonstriert. So konnten ARNON & SHAPIRA (25) zeigen, daß Antikörper, die gegen isolierte Haptene auf dem Apoenzym gerichtet waren, nach Bindung am intakten Antigen die Enzymaktivität nicht störten, daß jedoch Antikörper, die gegen prosthetische Gruppen gerichtet waren, dasselbe Enzym total blockierten. Bei Versuchen mit Kaninchen Anti-Peroxidase Hyperimmunseren konnte STRAUS ebenfalls beobachten, daß 50% der Enzymaktivität zerstört wurde. (22) Dieser Befund wurde von STRAUS jedoch nicht als Heterogenität der Antikörperspezifizität, sondern als Folge der unterschiedlichen Affinität gegen verschiedene Bindungsstellen interpretiert. ALLAEN & MORRISON konnten dagegen direkt zeigen, daß die Majorität der Antikörper gegen das Enzym Lactoperoxidase spezifisch gegen Determinanten auf dem Apoenzym gerichtet ist, während nur ein geringer Teil gegen das Coenzym selbst wirksam war (26) .

Wenn wir annehmen, daß Antikörper gegen Meerrettich-Peroxidase ähnlich heterogen sind, können wir die histochemisch nachweisbare Enzymaktivität nach erfolgter spezifischer Reaktion zwischen Enzym und anti-Enzym so deuten, daß wir nur diejenigen Antikörper erfassen können, die gegen das Apoenzym gerichtet sind, während die gegen das Coenzym gerichteten Antikörper mit unserer histochemischen Methode nicht erfaßbar sind.

1.2.

Zur Kontrolle der Spezifität des Nachweises der Antigen-Antikörperbindung durch histochemische Reaktion, müssen weiter folgende Punkte berücksichtigt werden:

1) Direkter Ausschluß unspezifischer intrazellulärer Anlagerungen exogener Peroxidase
2) Ausschluß endogener Peroxidase, wie sie in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen zu beobachten ist.

Eine unspezifische Anfärbung der Zellen erfolgt bei zu langer Inkubation der fixierten Präparate oder bei Verwendung von zu hoch konzentrierten Inkubationslösungen. STRAUS empfiehlt 0,1 mg/ml Peroxidase für die Inkubationslösung (22), LEDUC 0,5 mg/ml (9), AVRAMEAS 0,8 mg/ml (8). Wir sahen bei höheren Konzentrationen als 1 mg/ml Peroxidase nach einstündiger Inkubation bei $4^{o}C$ eine unspezifische Haftung des Enzyms an Zell- und Kernmembranen. Unspezifische Auflagerungen entstehen besonders leicht in mit Glutaraldehyd fixierten

Präparaten nach ungenügendem Wässern der fixierten Präparate. Glutaraldehydreste wirken als Konjugationsmittel (27). Die entstandenen Konjugate können auch durch nachträgliches intensives Waschen nicht entfernt werden. Die unspezifische Natur dieser Auflagerung ist daran zu erkennen, daß sie auf allen Zellen zu finden ist.

Häufig können Peroxidase-positive Granulozyten und Monozyten lichtmikroskopisch schwer von anti-Peroxidase-antikörperbildenden lymphatischen Zellen unterschieden werden. Die Bestimmung der anti-Peroxidase-antikörperbildenden Zellen setzte eine sorgfältige Auswertung von Kontrollpräparaten voraus, die nicht mit Peroxidase inkubiert worden waren. Die quantitative Auswertung der Präparate mit Hilfe der Zytozentrifuge ergibt nach unseren Befunden statistisch signifikante Werte.

2.1. Diskussion der Trennergebnisse

Die Änderungen der Frequenz von Lymphknoten-Zellen und spezifischen anti-Peroxidase-Antikörper-produzierenden Zellen in elektrophoretisch getrennten Fraktionen wurde im Verlauf der Primärantwort in Peroxidase immunisierten Ratten verfolgt. Das Verteilungsprofil der immunisierten Lymphknoten-Zellen war durch die Zellzunahme in dem Bereich geringer elektrophoretischer Beweglichkeit charakterisiert. Neben einer erhöhten Proliferation lymphoider Zellen ist dafür eine aktive Zuwanderung aus der Peripherie über die afferente Lymphe verantwortlich (28). Die zelluläre Immunantwort war nur im

Bereich geringer elektrophoretischer Beweglichkeit zu beobachten.

Die anti-Peroxidase-Antikörper-produzierenden Zellen konnten mit Hilfe der Elektrophorese in zwei Subpopulationen getrennt werden. Die Zellpopulation geringer elektrophoretischer Beweglichkeit bestand aus Lymphoblasten und kleinen Lymphozyten. Diese Zellen wurden bereits 72 Stunden nach Immunisierung beobachtet, nahmen geringfügig zu bis 96 Stunden und waren 120 Stunden nach Immunisierung nicht mehr nachweisbar. Die zweite Subpopulation erschien erst 84 Stunden nach Immunisierung, nahm dann exponentiell zu, und beherrschte 120 Stunden nach Immunisierung allein das Bild. Die Zellen dieser Population wanderten in einem Bereich höherer elektrophoretischer Beweglichkeit und bestanden morphologisch ausschließlich aus Plasmazellen.

Untersuchungen der elektrophoretischen Beweglichkeit von 19 S antikörperbildenden Zellen zeigten Verteilungsprofile von Blasten und reifen Plasmazellen (4), die identisch waren mit denen der anti-Peroxidase-antikörperbildenden Zellen in den vorliegenden Versuchen. Während mit dem direkten Jerne-Test ausschließlich 19 S Hämolysin-produzierende Zellen nachgewiesen werden, können bei den anti-Peroxidase-antikörperbildenden Zellen sowohl 19 S wie 7 S Untergruppen erfaßt werden. Aus Untersuchungen von BOSMAN und FELDMAN (29), bzw. WARNER und OVARY (30), geht hervor, daß die Antikörper gegen Peroxidase und ähnliche niedermolekulare lösliche Proteine, sowohl in der Primär- wie in der Sekundärantwort, ein Gemisch von 19 S und 7 S Antikörpern darstellen.

Analog zu unseren Versuchsergebnissen darf somit angenommen werden, daß sich die anti-Peroxidase-antikörperbildenden Zellen im Bereich der Lymphozyten und Blasten, sowie im Bereich der reifen Plasmazellen sowohl aus 19 S als auch aus 7 S Antikörperproduzierenden Zellen zusammensetzen. Die Annahme, daß durch die Separationsmethode Produzenten unterschiedlicher Immunglobulinklassen getrennt werden können, erscheint als unwahrscheinlich, da die schnell wandernde Zellpopulation keine Blasten oder aktive Lymphozyten, andererseits die langsam wandernde anti-Peroxidase-produzierende Zellpopulation keine reifen Plasmazellen enthält.

Da heute eindeutig geklärt ist, daß die Sequenz der Differenzierung von antikörperbildenden Zellen in der Reihenfolge
32) Lymphozyten-Blasten-Plasmazellen abläuft (41), erschienen die zeitlich nacheinander auftretenden elektrophoretisch trennbaren Populationen anti-Peroxidase-bildender Zellen demnach als verschiedene Reifestadien sich differenzierender Antikörperbildner.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Reifung der antikörperbildenden Zellen mit einer Erhöhung der Ladungsdichte der Oberflächen einhergeht, unabhängig von molekularer Struktur und Spezifität des gebildeten Antikörpers. Die Ursachen, die zu einer Erhöhung des Zetapotentials der Zellen während dieser Differenzierung führen, sind ungeklärt.

Folgende Punkte können diskutiert werden:

1) Die elektrophoretische Beweglichkeit der Zellen erhöht sich auf Grund von Volumensänderungen der Zellen bei unverändert gleicher Oberflächenladungsdichte. Entsprechend der SMOLUCHOWSKI'schen Betrachtungsweise der elektrokinetischen Phänomene ist zu erwarten, daß größere Partikel gleicher Ladungsdichte rascher wandern (33, 34) Nach unseren experimentellen Befunden sind antikörperbildende Zellen unterschiedlicher Volumina jedoch von gleichem Reifegrad in den gleichen Fraktionen anzutreffen.

2) Bei Messungen mit der analytischen Zellelektrophorese wurde an verschiedenen Zellreihen beobachtet, daß Zellen dann, wenn sie in ein Stadium hoher mitotischer Aktivität treten, ihre elektrophoretische Beweglichkeit erhöhen (6,7). Die Bereitstellung differenzierter Antikörperbildner erfolgt, wie man heute weiß, in zwei Phasen. In der ersten Phase während des Initialstadiums der Immunantwort treten B Zellen eines bestimmten Clonus mit antigenreaktiven T Zellen in Kontakt, um sich dann in spezifische Antikörperbildner zu entwickeln (35). Diese Betrachtung gilt mit der Einschränkung, daß sie zunächst nur für die T-Zell-abhängige humorale Immunreaktion diskutiert wird (36). Da offensichtlich mehrere B Zellen mit einer T Zelle kooperieren können, kann durch die Anzahl der Kontakte oder durch die Anzahl der vorhandenen B Zellen die Höhe der zellulären Antwort ge-

steuert werden (37). Die zweite Phase (Proliferation) umfaßt das Stadium der Blasten- und Plasmazelldiffezenzierung. Aus Arbeiten über den Generationszyklus dieser Zellen an Hand elektrophoretisch getrennten Materials war ersichtlich, daß sowohl antikörperbildende kleine Lymphozyten wie Blasten und Plasmazellen (unreife Plasmazellen) einen hohen mitotischen "turnover" besitzen (38). Messungen der Generationszyklen mit der Hilfe von DNA-RNA Doppelmarkierung zeigten sogar einen kürzeren Generationszyklus und eine kürzere S Phase bei Blasten als bei Plasmazellen. Die Annahm , daß Die Erhöhung der Mitoseaktivität zu einer Erhöhung der EPM führt, scheint somit nicht ganz stichhaltig zu sein.

3) Antikörperbildende Zellen ändern ihre EPM als Folge ihrer Differenzierung oder Reifung. Gute Hinweise bezüglich Veränderungen von Oberflächenmembranstrukturen während der Differenzierung antikörperbildender Zellen liefern Arbeiten über die Verteilung von antikörperähnlichen Oberflächenrezeptoren auf B-Zellen (39, 40). HÄMMERLING und RAJEWSKI konnten diese Rezeptoren auf reifen Antikörperbildnern nicht mehr nachweisen (5). Ob dieser Verlust oder diese Maskierung der Rezeptoren in einem direkten Zusammenhang mit der Erhöhung der EPM steht, wie es von S. NORDLING (41) als Folge einer Entblockung der β- Carboxylgruppen diskutiert wird, ist ungeklärt und erscheint fraglich, da B-Vorläuferzellen keine Immunglobulinrezeptoren besitzen (NOS-

SAL, persönl. Mitteilung), jedoch dieselben EPM aufweisen wie ihre Tochterzellen, die B Zellen (42).

In diesem Zusammenhang soll darauf hingewiesen werden, daß Differenzierungen auch mit einer Verminderung der elektrophoretischen Beweglichkeit einhergehen können, wie es am Beispiel der Granulozytenentwicklung gezeigt werden konnte (43). Ob und in welcher Weise die Erhöhung der elektrophoretischen Beweglichkeit als Ausdruck von Oberflächenstrukturumwandlungen in Beziehung zur Funktion der antikörperbildenden Zelle steht, bleibt ungeklärt.

4) Änderungen der EPM könnten auch die Folge eines "coatings" der Zelloberflächen durch sezernierte Antikörper sein. Dagegen spricht jedoch, daß nach Ablauf der zellulären Immunantwort die elektrophoretische Beweglichkeit der reifen Plasmazellen erhalten bleibt, obwohl in den Zellen keine Antikörper mehr nachweisbar sind. Außerdem wissen wir aus früheren Versuchen, daß die Inkubation von lymphoiden Zellen mit cytophilen Antikörpern ebenfalls zu keiner Veränderung der elektrophoretischen Beweglichkeit der Zellen führt (44). Passiv adsorbierte Antikörper scheinen also keinen wesentlichen Einfluß auf die Beweglichkeit lymphoider Zellen zu haben.

V. Zusammenfassung

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß mit Hilfe der trägerfrei-

en Elektrophorese antikörperbildende Zellen während ihrer Differenzierung in zwei verschiedene Populationen aufgetrennt werden können. Zellen des frühen Differenzierungsstadiums wie Antikörper-produzierende Lymphozyten und Blasten weisen geringere elektrophoretische Beweglichkeit auf als Zellen späterer Differenzierungsstufen wie unreife und reife Plasmazellen. Durch die direkte lichtmikroskopische Differenzierung von Antikörperbildnern definierter Spezifität konnte eindeutig gezeigt werden, daß die elektrophoretischen Verteilungsdiagramme dieser Populationen Gauß'sche Verteilungsmuster darstellen. Im Vergleich zu Antikörperbildnern anderer Spezifitäten und Immunglobulinklassen konnten keine Unterschiede in den EPM festgestellt werden. Die Ursachen, die zur Erhöhung der elektrophoretischen Beweglichkeit eines sich differenzierenden Clonus führen können, wurden diskutiert. Obwohl zum heutigen Zeitpunkt noch keine direkten und überzeugenden Hinweise für die Ursachen dieser Änderungen vorliegen, scheint sich die Änderung der EPM auf Umwandlungen der Zelloberflächenstruktur zurückführen zu lassen. Durch die vorliegende Arbeit konnte eindeutig bestätigt werden, daß mittels der trägerfreien Ablenkungselektrophorese Zellpopulationen definierter Funktionen mit hoher Trennschärfe isoliert werden können.

LITERATUR

1 Hannig, K., Zeiller, K. Hoppe-Seyler's Z. 350:467 (1969)

2 De Petris, S., Karlsbad, G. J. Cell Biol. 26:759-778 (1965)

3 Nakane, P.K., Pierce, G.B. J. Cell Biol. 33: 307-318 (1967)

4 Zeiller, K., Pascher, G., Hannig, K.
Hoppe-Seyler's Z. 351: 435 (1970)

5 Hämmerling, U., Rajewsky, K. Eur. J. Immunol. 1: 447-452 (1971)

6 Mayhew, E., O'Grady, E.A. Nature 207: 86 (1965)

7 Ruhenstroth-Bauer, G., Fuhrman, G.F., Granzer, E., Küebler,W.,
Rueff, F. Naturwissenschaften 49: 363 (1962)

8 Avrameas, S., Bouteille, M. Exp. Cell Research 53: 166-176 (1968

9 Leduc, E.H., Avrameas, S., Bouteille, M.
J. Exp. Med. 127: 109-118 (1968)

10 Sordat, B., Sordat, M., Hess, M.W., Stoner, R.D., Cottier, H.
J. Exp. Med. 131: 77-85 (1970)

11 Graham, R. S., Karnowsky, M.J. J.Histochem. Cytochem.
14: 291-302 (1966)

12 Nakane,P., Pierce, B. J. Histochem. Cytochem. 14:929-931 (1967)

13 Zeiller, K.,Liebich, H.G., Hannig, K.
Eur. J. Imm nol. 1: 315 (1971)

14 Hannig, K. in: Gerritsen, Th. (Ed.) Progress in Separation
and Purification Vol. 2, Willey-Interscience
& Sons,New York, 1969, p. 45

15 Leif, R. (unpubl. Manuscript)

16 Gömöri, G. (Ed.) Enzymes, in: Microscopic Histochemistry;
Principles and Practice pp. 162-165
University of Chicago Press, Chicago (1953)

17 Pierce, A.G.E. Histochemistry, Theoretical and Applied
2nd edition, Little, Brown & Co.Boston(1960)

18 Fisher, R.A., Yates, F. Statistical Tables for Biological,

18 Fisher, R.A., Yates, F. "Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research" publ. by Oliver & Boyd Ltd., Edinburgh (1963)

19 Mallory, E.B. (Ed.) Pathological Technique. W.B. Saunders & Co., Philadelphia, London (1942)

20 Wachstein, M., Meisel, E. Histochem. Cytochem. 12: 538 (1964)

21 Popp, R.A., Gude, W.D., Popp, D.M., Stain Technology 37: 243-247 (1962)

22 Straus, W. J. Histochem. Cytochem. 16: 237-248 (1968)

23 Straus, W. J. Histochem. Cytochem. 12: 470-480 (1964)

24 Arnon, R. Current topics in Microbiology and Immunology 54, 47-93 (1971)

25 Arnon, R., Shapira, E. Biochemistry 6: 3942-3950 (1967)

26 Allen, P.Z., Morrison, M. Arch. Biochem. Biophysic. 102: 106-113 (1963)

27 Avrameas, S. Immunochemistry 6: 43-62 (1969)

28 Dresser, D.W., Taub, R.N., Krantz, A.R. Immunology, 18: 663 (1970)

29 Bosman, C., Feldman, J.D. Cell. Immunol. 1: 31-50 (1970)

30 Warner, N.L., Vaz, N.M., Ovary, Z. Immunol. 14:725-734 (1968)

31 Nossal, G.J.V., Mäkelä, O. J. Exp. Med. 115: 209 (1962)

32 Michalke, W.D., Hess, M., Riedwyl, M., Stoner, D., Cottier, H. Blood, 33, 541 (1969)

33 Smoluchowski, M.v. Z. phys. Chem. 93: 129 (1918)

34 Henry, D.C. Proc. Roy. Soc. 133: 106 (1931)

35 Miller, J.F.A.P., Mitchell, G.F. Transpl. Rev. 1: 3 (1969)

36 Leuchars, E. "Spectrum of Thymus Dependency" Symposium on the role of the lymphocytes and macrophages in the immunological response. XIII. International Congress of Haematology (Ed. by D.C. Dumonde) Springer Verlag, Berlin(1970

37 Shearer, G.M., Cudkowicz, G., Priore, R.L. J. Exp. Med. 129 185-189 (1968)

38 Anthopoulos, J., Zeiller, K. (in Vorbereitung)

39 Walters, C.S., Wigzell, H.J. J.Exp. Med. 132: 1233 (1970)

40 Cone, R.E., Marchalonis, J.J., Rolley, R.T. J.Exp. Med. 134: 1373-1384 (1971)

41 Nordling, S.,Anderson, L.C., Häyry, P. (Nature, in Druck)

42 Zeiller, K., Holzberg, E., Pascher, G. Hoppe Seyler's Z. 353: 105-110 (1972)

43 Lichtmann, M.A. Weed, R.I. Blood, 35: 12-22 (1970)

44 Zeiller, K. (persönl. Mitteilung)

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Kurt Hannig für die freundliche Überlassung des Arbeitsplatzes, sowie bei Herrn Dr. med. Zeiller für die Einführung in wissenschaftliche Arbeitsweisen. Frau Dipl.Chem. Gertrude Pascher möchte ich für die Korrektur der Arbeit besonders danken.

Lebenslauf

Am 24. März 1942 wurde ich als Tochter des Neurologen Dr. Gustav Schmidt und seiner Ehefrau Piroschka, geb. Bakos in Szeged (Ungarn) geboren. Nach dem Krieg zogen wir nach Pecs (Funfkirchen) und schließlich nach Budapest, wo ich das "Haman Kato" Mädchengymnasium besuchte und dort 1960 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1960/61 fing ich das Medizinstudium in Budapest an. 1962 starb mein Vater, damals Dozent der Medizinischen Fakultät der Universität zu Budapest.

Im Herbst 1965 kam ich in die Bundesrepublik, wo ich noch im gleichen Jahr die deutsche STaatsangehörigkeit zuerkannt bekam. Das Studium der Medizin setzte ich in München fort, wo ich am 14. 2. 1968 das Staatsexamen bestand. Nach 4 Monatigem Aufenthalt in Frankfurt, wo ich die Medizinalassistentenzeit für Chirurgie abgeleistet habe, kam ich zurück nach München und heiratete Dr. Sebastian Holzberg aus Heidelberg. Dann arbeitete ich in dem "Max-von-Pettenkofer Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie" als Medizinalassistentin, später - nach der Geburt meiner Tochter Katerina - als Doktorand in dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung wo ich auch jetzt tätig bin.

Edit Holzberg